



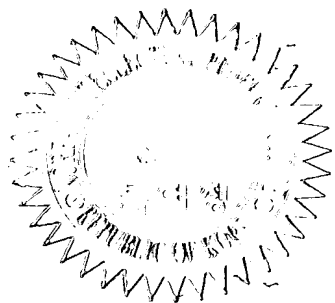
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2001-0011797  
Application Number

출원 년 월 일 : 2001년 03월 07일  
Date of Application MAR 07, 2001

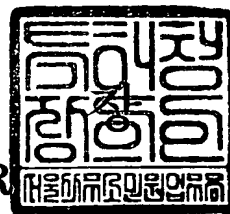
출원인 : 주식회사 프로바이오닉  
Applicant(s) Probioninc Inc.



2005 년 01 월 11 일

특 허 청

COMMISSIONER



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## 【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.09.27
【제출인】	
【명칭】	주식회사 프로바이옌
【출원인코드】	1-2000-028349-4
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-033252-5
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0011797
【출원일자】	2001.03.07
【심사청구일자】	2001.03.07
【발명의 명칭】	로타바이러스 및 유해 미생물 억제 활성을 가지는 신규내산성 락토바실러스 루테리 프로바이오-16 및 이를 함유하는 생균활 성제
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2003-0329876-82
【발송일자】	2003.08.28
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이원희 (인)

1020010011797

출력 일자: 2005/1/12

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 1항 또는 제 2항의 락토바실러스 루테리 미생물을 이용하여 로타바이러스 및 유해 미생물의 생장을 억제하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 4항에 있어서, 락토바실러스 루테리는 락토바실러스 루테리 Probio-16(수탁 번호: KCCM 10214)인 것을 특징으로 하는 유해 미생물의 생장을 억제하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 1항 또는 제 2항의 미생물을 함유하는 생균활성제(Probiotics).

## 【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.04.25
【제출인】	
【명칭】	주식회사 프로바이오닉
【출원인코드】	1-2000-028349-4
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-033252-5
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0011797
【출원일자】	2001.03.07
【심사청구일자】	2001.03.07
【발명의 명칭】	로타바이러스 및 유해 미생물 억제 활성을 가지는 신규 내산 성 락토바실러스 루테리 프로바이오-16 및 이를 함유하는 생 균활성제
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2001-0017355-00
【발송일자】	2001.04.07
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	첨부서류
【보정방법】	제출
【보정내용】	
【첨부서류】	1. 중소기업법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당 함을 증명 하는 서류_2통[사업자등록증 사본, 중소 기업기준검토표 사본 ]
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제 출합니다. 대리인 이원희 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류\_2통[중소기업감면서류]

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.07
【발명의 명칭】	로타바이러스 및 유해 미생물 억제 활성을 가지는 신규 내산성 락토바실러스 루테리 프로바이오-16 및 이를 함유하는 생균활성제
【발명의 영문명칭】	Acid-tolerant Lactobacillus reuteri Probio-16 suppressing the growth of pathogenic microorganisms and rotavirus, and Probiotics containing the same
【출원인】	
【명칭】	주식회사 프로바이오닉
【출원인코드】	1-2000-028349-4
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-033252-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박용하
【성명의 영문표기】	PARK, Yong-Ha
【주민등록번호】	590101-1005811
【우편번호】	158-070
【주소】	서울특별시 양천구 신정동 목동아파트 1302동 1507호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	윤정훈
【성명의 영문표기】	Y00N, Jung-Hoon
【주민등록번호】	691125-1695718
【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 52
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이인선  
 【성명의 영문표기】 LEE, In-Seon  
 【주민등록번호】 610813-2036816  
 【우편번호】 441-703  
 【주소】 경기도 수원시 권선구 구운동 삼환아파트 3동 110호  
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김철중  
 【성명의 영문표기】 KIM, Chul-Joong  
 【주민등록번호】 561213-1002325  
 【우편번호】 305-345  
 【주소】 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 103동 801호  
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장영호  
 【성명의 영문표기】 CHANG, Young Hyo  
 【주민등록번호】 650225-1634615  
 【우편번호】 302-723  
 【주소】 대전광역시 서구 관저동 구봉마을아파트 803동 806호  
 【국적】 KR

【심사청구】

청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물배양센터  
 【수탁번호】 KCCM-10214  
 【수탁일자】 2000.09.20

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 3  
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 이원희 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 5 면 5,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 7 항 333,000 원

【합계】 367,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 183,500 원

## 【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2. 미생물기탁증명서\_1통[및 동번역문 각] 3. 중소기업법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류 \_1통

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은 락토바실러스 루테리 프로바이오-16(*Lactobacillus reuteri* Probio-16)에 관한 것으로서, 구체적으로는 동물체의 체내 및 장내에서 유해한 성질을 나타내는 여러 종의 병원성 미생물 및 로타바이러스의 생육을 효과적으로 억제하고 내산성, 내담즙산성 기능을 가지는 락토바실러스 루테리 프로바이오-16에 관한 것이다. 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16은 장내미생물 군총의 안정화를 이루며 설사 등 장내 유해한 미생물의 이상발효에 의하여 발생할 수 있는 증상들을 치료하거나 사전에 예방할 수 있는 생균활성제이며, 기존 항생제의 대체용으로 인체 및 각종 가축에게 투여하는 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품 등의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

로타바이러스 및 유해 미생물 억제 활성을 가지는 신규 내산성 락토바실러스 루테리 프로바이오-16 및 이를 함유하는 생균활성제{Acid-tolerant *Lactobacillus reuteri* Probio-16 suppressing the growth of pathogenic microorganisms and rotavirus, and Probiotics containing the same}

## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 락토바실러스 루테리 프로바이오-16(*Lactobacillus reuteri* Probio-16)에 관한 것으로서, 구체적으로는 동물체의 체내 및 장내에서 유해한 성질을 나타내는 여러 종의 병원성 미생물 및 로타바이러스의 생육을 효과적으로 억제하고 내산성, 내담즙산성 기능을 가지는 락토바실러스 루테리 프로바이오-16에 관한 것이다.

<2> 국내·외 돼지 사육 현장에서 발생하는 중요한 전염병인 돼지 설사병의 하나인 돼지 로타바이러스 감염 설사증은 양돈장 및 자연환경에 서식하는 돼지 로타바이러스에 의해서 일어나며 전염성 위장염 및 대장균에 의한 2 차 감염에 의해 폐사율이 증가하는 심각한 질병이다. 돼지 로타바이러스 감염 설사증은 바이러스성 질병이므로 항생제를 투여하더라도 로타바이러스에 대한 치료 효과를 볼 수 없으며 단지 2 차 감염을 일으키는 미생물에 대한 치료 효과를 볼 수 있으나 이마저도 육류내 항생제 잔존의 문제가 발생하게 된다. 돼지 로타바이러스 감염의 예

방을 위해 백신이 사용되고 있으나 백신의 사용에 의한 부작용이 또한 발생할 수 있다는 문제점이 있다.

<3> 인체 및 동물체의 장내에는 다양한 미생물들이 존재하면서 장내의 미생물 균총을 이루고 있다. 이러한 미생물 중에는 숙주 동물에 유용한 것으로 알려진 유산균 등의 유익한 미생물들이 있는가 하면 반대로 숙주에 직접적 또는 잠재적인 유해성을 가지는 대장균, 살모넬라, 포도상구균 등의 미생물들이 또한 포함된다. 인체 및 동물체의 경우 스트레스의 증가, 유해 세균의 감염 등의 외부 환경의 변화에 의해서 장내 미생물의 균총이 파괴될 경우 유해 미생물들의 급격한 성장으로 이어져 숙주동물의 건강상태를 악화시키거나 설사에서부터 심지어는 폐사의 위험으로까지 진행될 수 있다. 이러한 일이 발생하였을 경우 치료의 목적으로 항생제를 투여하게 되나 이러한 항생제는 체외로 완전히 배설이 되지 않고 숙주 내에 잔존하게되며 지속적인 투여시 유해 미생물들이 내성을 가지게 되므로 효과적인 치료를 할 수 없게 되는 상황이 발생하게 된다. 또한 현재는 가축의 경우 육류, 우유, 난 등의 항생제 잔존량에 대한 규제가 갈수록 엄격해지고 있으므로 지속적인 항생제의 사용 및 남용은 제고해야 할 문제로 이미 대두되어왔다. 이에 대한 대안으로 현재 생균활성제(Probiotics)에 대한 관심이 증대되고 있다.

<4> 생균활성제는 인체나 동물체의 장내에 서식하는 유익한 미생물을 분리하여 제제화한 것으로 호기성균균, 혐기성균균, 유산균, 효모균들이 사용되고 있으나 주로 유산균들이 주요 균주로 이용되고 있다. 이러한 유산균 프로바이오틱스는 항생제 남용으로 인해 발생할 수 있는 부작용을 일으키지 않고 장내 유해 세균의 이상발효를 억제하여 안정된 장내 균총을 유지하며

유해 미생물의 감염으로 인한 질병을 사전에 억제할 수 있다. 또한 생균활성제의 지속적인 투여는 사료효율을 높여주고 건강 유지를 통해 증체량의 증대를 꾀할 수 있다.

<5> 생균활성제로서의 효과적인 사용을 위해서는 유해한 미생물에 대한 억제 활성뿐만 아니라 내산성, 내담즙산성을 지니는 것이 매우 중요하다. 동물체에 생균활성제를 투여한 후 장에 도착할 때까지는 강산인 위액을 만나게 되고 그 다음 담즙산을 만나게 된다. 이들 위액과 담즙산은 일반적으로 세균을 죽이거나 활성을 떨어뜨리기 때문에 투여된 생균활성제가 무사히 장에 도달하여 그 기능을 발휘하기 위해서는 위액과 담즙산에 견딜 수 있는 성질을 가지고 있어야 한다.

<6> 지금까지 생균활성제 프로바이오틱스로 다양한 종류의 유산균이 발표되어 왔으며 내산, 내담즙산 특성을 가지면서 유해 미생물을 억제하는 락토바실러스 루테리로 동정된 생균활성제 또한 보고된 바 있다(장영효 등, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 23-27)(대한민국 특허 10-211529-0000).

<7> 이에, 본 발명자들은 기존의 발표된 생균활성제 보다 유해 미생물들을 더욱 효과적으로 억제할 수 있고 내산성, 내담즙산성을 지니며 추가적으로 로타바이러스의 생육을 억제하는 신규 생균활성제의 탐색을 시도한 결과, 돼지의 분변으로부터 혐기적으로 분리한 균주가 기존의 발표된 락토바실러스 루테리 균주 BSA-131(대한민국 특허 10-211529-0000)보다 유해 미생물에 대한 억제활성과 내산성, 내담즙산성 능력이 뛰어나며 로타바이러스의 생육을 효과적으로 억제할 수 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

- <8>        본 발명의 목적은 기존 항생제의 대체용으로 인체 및 각종 가축에게 투여하는 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품 등에 사용하여 로타바이러스 및 장내 유해한 미생물을 억제할 수 있는 내산성, 내담즙산성 생균활성제를 제공하는 것이다.

**【발명의 구성 및 작용】**

- <9>        상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 로타바이러스 및 유해 미생물을 억제할 수 있는 내산성, 내담즙산성 신규 미생물 락토바실러스 루테리 프로바이오-16(*Lactobacillus reuteri* Probio-16)을 제공한다.
- <10>       또한, 본 발명에서는 상기 미생물을 이용하여 로타바이러스 및 유해 미생물을 억제할 수 있는 방법을 제공한다.
- <11>       또한, 본 발명에서는 상기 미생물을 함유하는 생균활성제를 제공한다.
- <12>       또한, 본 발명에서는 상기 미생물을 함유하는 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품을 제공한다.
- <13>       이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <14>       본 발명에서는 로타바이러스 및 유해 미생물을 억제할 수 있는 내산성, 내담즙산성 신규 미생물 락토바실러스 루테리 프로바이오-16을 제공한다.

- <15>        상기 균주는 유해 미생물을 억제하는 미생물을 탐색한 결과 얻어진 새로운 락토바실러스 루테리 균주로서 로타바이러스 및 유해 미생물의 억제 능력이 우수하면서 내산성, 내담즙산성을 지니고 있다.
- <16>        본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 균주는 돼지 분변에서 분리된 간균으로서, 대장균(*E. coli*) KCTC 2441, 대장균(*E. coli*) KCTC 2571, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Salmonella enteritidis* kim sp14, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Proteus vulgaris* KCTC 2579, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, *Enterococcus lactis* KCTC 1913, *Serratia marscense* KCTC 2172, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 등에 대하여 우수한 생장 억제 활성을 나타낸다.
- <17>        구체적으로, 본 발명의 균주 락토바실러스 루테리 Probio-16이 유해 미생물의 생장을 억제하는 억제환의 지름(단위는 mm)은 다음과 같다. 대장균(*E. coli*) KCTC 2441에 대해 15 mm, 대장균(*E. coli*) KCTC 2571에 대해 17 mm, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208에 대해 15 mm, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621에 대해 16 mm, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917에 대해 18 mm, *Salmonella enteritidis* kim sp14에 대해 16 mm, *Shigella flexneri* KCTC 2008에 대해 16 mm, *Proteus vulgaris* KCTC 2579에 대해 15 mm, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361에 대해 18 mm, *Enterococcus lactis* KCTC 1913에 대해 15 mm, *Serratia marscense* KCTC 2172에 대해 15 mm, *Citrobacter freundii* KCTC 2006에 대해 15 mm, *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 16 mm 이다.
- <18>        이러한 유해 미생물의 생장의 억제를 위한 최적 배양온도는 30-37℃이었다.

- <19> 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 균주는 로타바이러스 생육 억제 실험에 대해서도 항바이러스 활성이 뛰어남을 알 수 있다. 구체적으로 TF-104 단층 세포에 로타바이러스를 접종하고 배양하여 상층액을 취하여 채독한 후 항바이러스 실험에 이용한 결과, 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16은 강한 항바이러스 활성을 나타내었다.
- <20> 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 균주는 항생제에 대한 감수성이 적은 것을 알 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 항생제에 대한 감수성 실험은 세파렉신(Cephalexin, 동화약품), 에리스로마이신(Erythromycin, Sigma사), 플루메퀸(Flumequinine, 대성미생물사), 푸라졸리딘(Furazolidine, 대성미생물사), 겐타마이신(Gentamycine, 동아바이오텍사), 페니실린(procaine Penicilline G, Antibioticos사), 노플락신(Norflaxacin, 대성미생물사), 스펙티노마이신(Spectinomycin, 대성미생물사), 테트라사이클린(Tetracycline, 대성미생물사), 티아물린(Tiamuline, 대성미생물사), 네오마이신(Neomycin, Sigma사), 클로람페니콜(Chloramphenicol, Sigma사), 가나마이신(Kanamycin, Sigma사) 등의 13종의 항생제에 대하여 실행하였으며, 항생제에 대한 매우 큰 내성을 확인하였다.
- <21> 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 형태 및 생리·생화학적 특성은 다음과 같다.
- <22> 락토바실러스 루테리 프로바이오-16은 그람양성의 세균으로 호기적인 조건과 혐기적인 조건에서 동시에 성장하며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없으며, 세포의 형태는 간균이다. 상기 균주의 성장 조건으로는 30~37℃이 바람직하다. 가스와 인돌을 생성하지 않으며 용혈성을 나타내지 않고 질산을 환원하지 않는다. 요소(urea), 단백질을 분해하지 못하고 만노스

(mannose) 와 라피노스(raffinose)를 발효하며 5% 담즙산에 내성을 나타낸다. 알지닌 디히드롤라제(alginine dehydrolase) 양성, 알지닌 아릴아미다제(alginine arylamidase) 양성, 프롤린 아릴아미다제(proline arylamidase) 양성, 루이실 글리신 아릴아미다제(leucyl glycine arylamidase) 양성, 루이신 아릴아미다제(leucine arylamidase) 양성, 페닐알라닌 아릴아미다제(phenylalanine arylamidase) 양성, 타이로신 아릴아미다제(tyrosine arylamidase) 양성, 알라닌 아릴아미다제(alanine arylamidase) 양성, 글리신 아릴아미다제(glycine arylamidase) 양성, 히스티딘 아릴아미다제(Histidine arylamidase) 양성, 세린 아릴아미다제(serine arylamidase) 양성, 알파-갈락토시다제(alpha-galactosidase) 양성, 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase) 양성, 알파-글루코시다제(alpha-glucosidase) 양성, 베타-글루코시다제(beta-glucosidase) 양성, 알파-아라비노시다제(alpha-arabinosidase) 양성, 베타-글루쿠로니다제(beta-glucuronidase) 양성이며 카탈라제(catalase) 음성, 리피제(lipase) 음성 이며, 레시티나제(lechthinase) 음성, 알칼리 포스파타제(alkali phosphatase) 음성, 글루타민산 탈카르복실라제(glutamate decarboxylase) 음성, 피로 글루타민산 아릴아미다제(pyro glutamate arylamidase) 음성, 글루타밀 글루타민산 아릴아미다제(glutamyl glutamate arylamidase) 음성, 6-인산 베타-갈락토시다제(6-phosphate-beta-galactosidase) 음성, 베타-N-아세틸-글루코사미니다제(beta-N-acetyl-glucosamidase) 음성, 알파-푸락토시다제(alpha-fructosidase) 음성이다.

<23> 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16의 16S rRNA 유전자의 염기 서열은

서열번호 1로 기재되며, 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 통하여 본 발명의 균주는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속에 속하는 균주로서 99.5%의 16S rDNA 상동성으로 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 표준균주에 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보여주는 균주로 동정되었다.

<24> 따라서, 상기의 결과에 기초하여 본 발명의 균주를 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 새로운 균주로 동정하고, 한국미생물보존센터에 2000년 9월 20일자로 기탁하였다(수탁번호: KCCM 10214).

<25> 또한, 본 발명은 본 발명의 락토바실러스 루테리 프로바이오-16을 이용하여 로타바이러스 및 유해 미생물을 억제할 수 있는 방법을 제공한다.

<26> 상기 방법에서, 락토바실러스 루테리 프로바이오-16이 유해 미생물을 억제하기 위한 최적 온도 조건으로는 30-37℃가 바람직하다.

<27> 또한, 본 발명은 락토바실러스 루테리 프로바이오-16을 함유하는 생균확성제를 제공한다.

<28> 또한, 본 발명은 락토바실러스 루테리 프로바이오-16을 함유하는 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품을 제공한다.

<29> 본 발명의 미생물은 기존 항생제의 대체용으로 인체 및 각종 가축에 대해 장내 유해한 미생물을 억제하며 안정된 장내 균총의 유지를 통해 동물체의 건강상태를 양호하게 하고 가축

의 증체량 증가, 육질 개선, 산유량 증가, 면역력 증가 등의 목적으로 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품 등에 사용할 수 있다.

<30> 본 발명의 미생물은 장기간 안정적으로 보존하기 위해 글리세롤 성분을 포함하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하거나 멸균된 10% 탈지유에 현탁하여 동결건조하는 것이 바람직하다.

<31> 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

<32> 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<33> <실시예 1> 내산, 내담즙산 성질을 가지는 세균의 분리

<34> 대전직할시 소재의 축사에서 길러지고 있는 11 개월령의 건강한 암돼지로부터의 분변을 혐기백(상품명 Gas Pack pouch; BBL사 제품)을 이용하여 혐기적으로 채취하였다. 채취한 분변 1 g은 pH 2로 조정된 혐기희석액(0.78%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  염혼합액 37.5 ml, L-cystein 0.5 g, 25% L-ascorbic acid 2 ml, 8%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 ml, 0.1% 레사주린(resazurin) 1 ml을 증류수 860 ml에 녹이고, 아가(agar) 0.5 g을 첨가)을 이용하여 1:10 의 비율로 희석하고, 진탕기를 이용하여 120 분간 진탕하였다. 진탕액 1 ml을 옥스갈(디프코사 제품) 0.2%를 첨가한 BL 고체배지(일본 영연화학사 제품)(Lab-lemco powder 2.4 g, Proteose peptone No.3 10 g, Trypticase 5 g, Phytone peptone 3 g, yeast extract 5 g, liver extract 150 ml, 포도당 10 g, 용해성 전분 0.5 g, sol.A 10 ml, sol.B 5 ml, 10% FS antifoam F-20 5 ml, Tween 80 1 g, L-cystein 0.5 g, horse serum 50 ml을 증류수 1 l에 녹이고, 아가 15 g을 첨가하여 제조한 것으로서 여기서

sol.A는 10%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 과 10%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 을 혼합한 것이며; sol.B는 황산마그네슘 10 g, 황산철 0.5 g, 소금 0.5 g, 황산망간 0.337 g을 증류수 250 ml에 녹임)에 도달하고, 37℃에서 48 시간 배양하였다. 일정시간이 지난 후 나타나는 콜로니를 현미경으로 관찰한 후 간균형 미생물 144개를 선별하여 GAM semi-agar 배지(일본 일수제약사 제품)(peptone 10 g, Soya peptone 3 g, Proteose peptone No.3 10 g, Peptonized whale serum 13.5 g, yeast extract 5 g, Beef extract 2.2 g, liver extract 1.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g, NaCl 3 g, L-cystein 0.3 g, Na thioglycolate 0.3 g, 포도당 2 g를 증류수 1 l에 녹이고, 아가 1.5 g을 첨가)에 옮겨 배양한 뒤, 영하 -80℃에서 보존하였다.

<35> <실시에 2> 분리된 미생물의 로타바이러스 생장 억제 실험

<36> TF-104 단층 세포를 인산완충용액으로 2회 세척한 다음 돼지에서 분리한 로타바이러스를 접종하고 약 30분간 바이러스를 세포에 흡착시킨 후 소 혈청(bovine serum)을 포함하지 않은 최소배지(Eagle's minimum essential medium)를 첨가하고 추가로 적당량의 트립신을 배지에 첨가하여 37℃ 배양기에서 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effects, CPE)를 관찰하였다. 단층세포에 세포변성효과가 약 70% 정도 관찰될 때 MEM 배지를 포함한 감염세포를 -70℃에서 2차례 냉동 및 해동을 반복한 후 채득한 다음 원심분리하여 세포성분을 제거한 상층액을 -70℃에 보관하면서 시험에 공여하였다. 96공(96-well) 세포배양 플레이트에 TF-104 단층세포를 준비하고 이를 인산완충용액으로 2회 세척한 다음 -70℃에 보관중인 로타바이러스를 10배 계단 희석법으로 희석하였고 각 희석 단계 별로 10개의 공(well)에 접종하고 72시간 동안 5%  $\text{CO}_2$ 를 포함하는 37℃ 세포배양기 내에서 배양하면서 세포변성효과를 관찰하였다. 상기 결과를 토대로 배양액 내에 존재하는 바이러스의 함량을 정량하였다(Davis et al., Microbiology 3rd

edition, Harper & Row Publishers, 1980). 항바이러스활성 시험은 로타바이러스 배양액에 트립신을 가하여 약 1 시간 동안 37℃에서 전 처리한 다음 소 혈청이 첨가되지 않은 최소배지를 배양액으로 희석하여 바이러스 역가가 1.0 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml, 10.0 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml, 100 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 및 1000 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml이 되도록 하였다. 96공 세포배양 플레이트에 TF-104 단층세포를 준비하고 이를 인산완충용액으로 2회 세척한 다음 락토바실러스 루테리 Probio-16 배양액 한 샘플 당 4 개의 공(well)을 사용하여 첫째, 둘째, 셋째 및 넷째 공에 각각 90  $\mu$ l의 1.0 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml, 10.0 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml, 100 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 및 1000 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml를 첨가하고 즉시 10  $\mu$ l(10%)의 락토바실러스 배양액을 각 공에 첨가 한 후 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 37℃ 세포배양기 내에서 배양하면서 시험 후 24시간, 48시간 및 72시간에서 세포변성효과를 관찰하였다. 본 시험에서 세포변성효과(cytopathic effects)가 관찰될 경우 배양액이 항바이러스 활성이 없는 것으로 판정하였다. 상기 간균형 미생물 144개 중에서 가장 항바이러스성이 큰 것을 Probio-16으로 선택하였으며, Probio-16의 로타바이러스에 대한 억제 활성을 하기 표 1에 나타내었다.

&lt;37&gt; 【표 1】

Probio-16의 로타바이러스에 대한 억제 활성

	접종 후 24시간 배양				접종 후 48시간 배양				접종 후 72시간 배양			
	1000	100	10	1	1000	100	10	1	1000	100	10	1
TCID	TCID	TCID	TCID <sub>50</sub>	TCID	TCID	TCID	TCID <sub>50</sub>	TCID	TCID	TCID	TCID	TCID
Probio-16	50	50	-	50	50	50	-	50	50	50	50	50

&lt;38&gt; &lt;실시에 3&gt; 분리된 미생물의 유해 미생물 생장 억제 실험

<39>       상기한 Probio-16을 대상으로 한 유해 미생물의 생장 억제 실험은 구로이와 등(Kuroiwa et al., 감염증학지, 64, 257, 1990)의 방법을 이용하였으며 사용된 유해 미생물의 종류는 항생제 평가시 통상적으로 사용되는 대장균(*E. coli*) KCTC 2441, 대장균(*E. coli*) KCTC 2571, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Salmonella enteritidis* kim sp14, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Proteus vulgaris* KCTC 2579, *Enterobacter cloacea* KCTC 2361, *Enterococcus lactis* KCTC 1913, *Serratia marscense* KCTC 2172, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, *Bacillus subtilis* KCTC 1021로서 이러한 유해 미생물은 MRS 액체배지(Difco 사)에서 18시간 혐기적으로 배양한 후 배양액 0.1 ml을 취하여 MRS 고체배지에 도말하였다. 그런 후 MRS 액체배지에서 18시간 혐기적으로 배양된 각각의 분리 미생물 배양액 30  $\mu$ l를 지름 8 mm의 페이퍼디스크에 접종한 후 유해미생물이 도말된 고체배지에 올려놓은 후 배양하였다. 일정 시간 동안 배양한 후 나타나는 억제환을 측정하여 대조군과 비교하였으며 Probio-16의 유해 미생물에 대한 억제 활성을 하기 표 2에 나타내었다.

## &lt;40&gt; 【표 2】

Probio-16의 유해미생물 억제 활성

대상 유해 미생물	Probio-16의 억제 활성(억제환의 지름, mm)
대장균( <i>E. coli</i> ) KCTC 2441	15
대장균( <i>E. coli</i> ) KCTC 2571	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	15
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	18
<i>Salmonella enteritidis</i> kim sp14	16
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	16
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2579	15
<i>Enterobacter cloacea</i> KCTC 2361	18
<i>Enterococcus lactis</i> KCTC 1913	15
<i>Serratia marscense</i> KCTC 2172	15
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	15
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	16

<41> 표 2에서 보는 바와 같이 Probio-16은 사용된 유해미생물 13 종에 대해서 대부분 유사한 억제 활성을 지니는 매우 유용한 미생물인 것으로 확인되었다. 또한 Probio-16은 기존의 락토바실러스 루테리 균주 BSA-131(장영효 등, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 23-27)(대한민국 특허 10-211529-0000) 보다 유해 미생물에 대한 억제 활성이 약간 더 뛰어남을 확인할 수 있었고 생존력 실험 또한 더 우수함을 확인하였다.

## &lt;42&gt; &lt;실시예 4&gt; Probio-16의 항생제에 대한 감수성 실험

<43> Probio-16의 항생제에 대한 감수성 실험은 Microbiology procedures handbook vol.1(Henry D. Isenberg, ASM)과 한국특허공고 91-4366호의 방법에 의거하여 13 종의 항생제에 대해 수행하였으며, 사용된 항생제 종류는 세파렉신(Cephalexin, 동화약품), 에리스로마이신(Erythromycin, Sigma사), 플루메퀸(Flumequinine, 대성미생물사), 퓨라졸리딘(Furazolidine, 대성미생물사), 겐타마이신(Gentamycine, 동아바이오텍사), 페니실린(procaine

Penicilline G, Antibioticos사), 노플락신(Norflaxacin, 대성미생물사), 스펙티노마이신(Spectinomycin, 대성미생물사), 테트라사이클린(Tetracycline, 대성미생물사), 티아몰린(Tiamuline, 대성미생물사), 네오마이신(Neomycin, Sigma사), 클로람페니콜(Chloramphenicol, Sigma사), 가나마이신(Kanamycin, Sigma사) 등으로 이들을 적절한 용매에 용해하여 사용하였다. 준비한 항생제 용액을 농도별로 30  $\mu$ l씩 페이퍼디스크에 점종하여 4℃, 1 시간 방치 후에 24시간 혐기적으로 배양한 후 나타나는 억제환의 직경을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

&lt;44&gt; 【표 3】

Probio-16의 항생제 감수성 결과

항생물질	최소억제농도( $\mu$ g/ml)
세파렉신(Cephalexin)	90
에리스로마이신(Erythromycin)	4
플루메퀸(Flumequinine)	4000
퓨라졸리딘(Furazolidine)	90
겐타마이신(Gentamycin)	100
페니실린(procaine Penicilline G)	4
노플락신(Norflaxacin)	1000
스펙티노마이신(Spectinomycin)	2500
테트라사이클린(Tetracycline)	1500
티아몰린(Tiamuline)	300
네오마이신(Neomycin)	100
클로람페니콜(Chloramphenicol)	200
가나마이신(Kanamycin)	4000

## &lt;45&gt; &lt;실시예 5&gt; 분리한 미생물 Probio-16의 동정

<46> 상기 실시예 1에서 분리된 Probio-16 균주를 MRS 배지(Difco사 제품)에서 37℃ 조건으로 배양하였다. Probio-16 균주를 동정하기 위하여, Probio-16의 형태 및 생리학적 특성은 윤 등(Yoon

*et al., Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 904, 1997)의 방법과 API 32A 및 CHL 키트(바이오메리오사 제품)를 사용하여 결정하였다. 16S rRNA 유전자의 염기 서열 결정 및 분석은 윤 등 (Yoon *et al., Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 933, 1997)의 방법을 사용하였다.

<47>      상기의 방법으로 결정한 Probio-16의 형태 및 생리·생화학적 특성을 하기 표 4에 나타내었다.

## &lt;48&gt; 【표 4】

Probio-16의 생리·생화학적 특성

특 성	결 과
aerotolerance	+
카탈라제	-
hemolysis	-
OF test	F
운동성	-
가스발생	-
포자형성	-
리파제	-
레시티나제	-
단백분해능	-
알칼리 포스파타제	-
urease	-
인돌생성	-
질산 환원능	-
알지닌 디히드롤라제	+
알지닌 아릴아미다제	+
프롤린 아릴아미다제	+
루이실 글리신 아릴아미다제	+
루이신 아릴아미다제	+
페닐알라닌 아릴아미다제	+
타이로신 아릴아미다제	+
알라닌 아릴아미다제	+
글리신 아릴아미다제	+
히스티딘 아릴아미다제	+
세린 아릴아미다제	+
글루타민산 탈카르복실라제	-
피로 글루타민산 아릴아미다제	-
글루타밀 글루타민산 아릴아미다제	-
알파-갈락토시다제	+
베타-갈락토시다제	+
6인산 베타-갈락토시다제	-
알파-글루코시다제	+
베타-글루코시다제	+
알파-아라비노시다제	+
베타-글루쿠로니다제	+
베타-N- 아세틸-글루코사미니다제	-
알파-푸락토시다제	-
만노스 발효	+
라피노스 발효	+
내담즙성(5%)	+
+ 양성; - 음성	

<49> 표 4에서 보는 바와 같이 Probio-16은 그람양성의 세균으로 호기적인 조건과 혐기적인 조건에서 동시에 성장하며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없으며, 세포의 형태는 간균이다. 상기 균주의 성장 조건으로는 30~37℃이 바람직하다. 가스와 인돌을 생성하지 않으며 용혈성을 나타내지 않고 질산을 환원하지 않는다. 요소(urea), 단백질을 분해하지 못하고 만노스(mannose)와 라피노스(raffinose)를 발효하며 5% 담즙산에 내성을 나타낸다. 알지닌 디히드롤라제(alginine dehydrolase) 양성, 알지닌 아릴아미다제(alginine arylamidase) 양성, 프롤린 아릴아미다제(proline arylamidase) 양성, 루이실 글리신 아릴아미다제(leucyl glycine arylamidase) 양성, 루이신 아릴아미다제(leucine arylamidase) 양성, 페닐알라닌 아릴아미다제(phenylalanine arylamidase) 양성, 타이로신 아릴아미다제(tyrosine arylamidase) 양성, 알라닌 아릴아미다제(alanine arylamidase) 양성, 글리신 아릴아미다제(glycine arylamidase) 양성, 히스티딘 아릴아미다제(Histidine arylamidase) 양성, 세린 아릴아미다제(serine arylamidase) 양성, 알파-갈락토시다제(alpha-galactosidase) 양성, 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase) 양성, 알파-글루코시다제(alpha-glucosidase) 양성, 베타-글루코시다제(beta-glucosidase) 양성, 알파-아라비노시다제(alpha-arabinosidase) 양성, 베타-글루쿠로니다제(beta-glucuronidase) 양성이며 카탈라제(catalase) 음성, 리피제(lipase) 음성 이며, 레시티나제(lechthinase) 음성, 알칼리 포스파타제(alkali phosphatase) 음성, 글루타민산 탈카르복실라제(glutamate decarboxylase) 음성, 피로 글루타민산 아릴아미다제(pyro glutamate arylamidase) 음성, 글루타밀 글루타민산 아릴아미다제(glutamyl glutamate arylamidase) 음성, 6-인산 베타-갈락토시다제(6-phosphate-beta-galactosidase) 음성, 베타-N-아세틸-글루코사미니다제(beta-N-acetyl-glucosamidase) 음성, 알파-푸락토시다제(alpha-fructosidase) 음성이다.

<50> Probio-16의 16S rRNA 유전자의 염기 서열은 서열번호 1로 기재된다. 구체적으로, 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정은 다음과 같이 행하였다. 윤 등(Yoon *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 502, 1996)의 방법에 의하여 추출한 DNA와 서열번호 2 및 서열번호 3으로 기재되는 프라이머 쌍을 사용하여 이전에 알려진 윤 등(Yoon *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 111, 1997)의 반응 조건에 따라 PCR을 시행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자는 PCR 생성물 정제 키트(Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 DNA 염기서열 키트(Applied Biosystems 사)를 사용하여 염기서열 반응을 시행하였다. 염기서열은 유전자 분석기(Genetic analyzer, Perkin Elmer 사)를 사용하여 결정하였다.

<51> 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석에서 Probio-16은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속에 속하는 균주로서 99.5%의 16S rDNA 상동성으로 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 표준균주에 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보여주는 균주로 동정되었다. 또한 Probio-16은 기존에 발표된 내산, 내담즙산 특성을 가지면서 유해 미생물을 억제하는 락토바실러스 루테리로 동정된 생균활성제 BSA-131(장영효 등, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 23-27 및 대한민국 특허 10-211529-0000)과 비교시 2개의 염기서열이 서로 다른 것을 발견하였으며, 이로부터 본 발명의 Probio-16은 종래의 락토바실러스 루테리 균주와는 서로 다른 균주인 것으로 확인할 수 있었다.

<52> 따라서, 상기의 결과에 기초하여 Probio-16은 기존의 생균활성제 BSA-131과는 다른 락토 바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 균주로 동정하고, 한국미생물보존센터에 2000년 9월 20일자로 기탁하였다(수탁번호: KCCM 10214).

#### 【발명의 효과】

<53> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 속의 새로운 미생물인 락토바실러스 루테리 Probio-16은 로타바이러스 및 병원성 세균을 억제하는 생균활성제인 프로바이오틱스로 동물의 체내 및 장내에서 유해한 성질을 나타내는 로타바이러스 및 여러 종의 병원성 세균을 효과적으로 억제하고 내산성, 내담즙산 기능을 가지고 있어 기존 항생제의 대체용으로 인체 및 각종 가축에게 투여시 장내미생물 균총의 안정화를 이루어 장내 유해한 미생물의 이상발효에 의하여 발생할 수 있는 증상들을 치료하거나 사전에 예방할 수 있으며 건강상태를 양호하게 하고 가축의 증체량 증가, 육질 개선, 산유량 증가, 면역력 증가 등의 효과를 얻을 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

로타바이러스 및 유해 미생물의 성장을 억제하는 락토바실러스 루테리 프로바이오-16(*Lactobacillus reuteri* Probio-16).

【청구항 2】

내산성, 내담즙산성을 가지면서, 항생제에 대하여 내성을 나타내는 락토바실러스 루테리 Probio-16(*Lactobacillus reuteri* Probio-16).

【청구항 3】

제 1항 또는 2항에 있어서, 락토바실러스 루테리는 락토바실러스 루테리 Probio-16(수탁 번호: KCCM 10214)인 것을 특징으로 하는 락토바실러스 루테리.

【청구항 4】

제 1항, 제 2항 또는 제 3항의 미생물을 이용하여 로타바이러스 및 유해 미생물의 성장을 억제하는 방법.

## 【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 미생물은 30℃~37℃에서 배양되는 것을 특징으로 하는 유해 미생물의 성장을 억제하는 방법.

## 【청구항 6】

제 1항 또는 제 2항의 미생물을 함유하는 생균활성제(Probiotics).

## 【청구항 7】

제 1 항 또는 제 2항의 미생물을 함유하는 사료첨가제, 식품첨가제, 동물약품 또는 의약품.

## 【서열목록】

<110> Probionic <120> Acid-tolerant Lactobacillus reuteri Probio-16 suppressing the growth of pathogenic microorganisms and rotavirus, and Probiotics containing them <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1531 <212> DNA <213> Lactobacillus reuteri Probio-16 <400> 1 gatgaacgcc ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgtac gcaactggccc aactgattaa 60 tgggtgcttgc acctgattga cgatggatca ccagtgagtg gcggacgggt gagtaacacg 120 taggtaacct gccccggagc gggggataac atttgaaac agatgctaata accgcataac 180 aacaaaagcc acatggcttt

tgtttgaaag atggcttttg ctatcactct gggatggacc	240 tgcggtgcat tagctagttg
gtaaggtaac ggcttaccaa ggcgatgatg catagccgag	300 ttgagagact gatcggccac
aatggaactg agacacggtc catactccta cgggaggcag	360 cagtagggaa tcttccacaa
tgggcgcaag cctgatggag caacaccgcg tgagtgaaga	420 agggtttcgg ctcgtaaagc
tctgttggtg gagaagaacg tgcgtgagag taactgttca	480 cgcagtgacg gtatccaacc
agaaagtcac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat	540 acgtaggtgg caagcgttat
ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag gcggttgctt	600 aggtctgatg tgaaagcctt
cggcttaacc gaagaagtgc atcggaacc gggcaacttg	660 agtgcagaag aggacagtgg
aactccatgt gtagcggtagg aatgcgtaga tatatggaag	720 aacaccagtg gcgaaggcgg
ctgtctggtc tgcaactgac gctgaggctc gaaagcatgg	780 gtagcgaaca ggattagata
ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt gctaggtgtt	840 ggagggtttc cgcccttcag
tgccggagct aacgcattaa gcaactccgcc tggggagtac	900 gaccgcaagg ttgaaactca
aaggaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg	960 gtttaattcg aagctacgcg
aagaacctta ccaggtcttg acatcttgcg ctaaccttag	1020 agataaggcg ttccttcgg
ggacgcaatg acaggtgggtg catggtcgtc gtcagctcgt	1080 gtcgtgagat gttgggttaa
gtcccgaac gagcgcaacc cttgttacta gttgccagca	1140 ttaagttggg cactctagt
agactgccgg tgacaaaccg gaggaagggtg gggacgacgt	1200 cagatcatca tgccccttat
gacctgggct acacacgtgc tacaatggac ggtacaacga	1260 gtcgcaagct cgcgagagta
agctaatctc ttaaagccgt tctcagttcg gactgtaggc	1320 tgcaactcgc ctacacgaag
tcggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga	1380 atacgttccc gggccttgta
cacaccgccc gtcacacat gggagtttgt aacgccc aaa	1440 gtcggtggcc taaccattat



1020010011797

출력 일자: 2005/1/12

ggagggagcc gcctaaggcg ggacagatga ctggggtgaa	1500 gtcgtaacaa ggtagccgta
ggagaacctg c	1531 <210> 2 <211> 19 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	forward primer <400> 2 gagtttgatc
ctggctcag	19 <210> 3 <211>
20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	reverse primer <400>
3 agaaaggagg tgatccagcc	20